

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : D04H 1/00, C12P 7/62, D04H 1/58	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/19212 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Mai 1997 (29.05.97)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04939</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 12. November 1996 (12.11.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 43 635.0 23. November 1995 (23.11.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HP-CHEMIE PELZER RESEARCH AND DEVELOPMENT LTD. [IE/IE]; Industrial Estate, Waterford (IE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PELZER, Helmut [DE/DE]; HP-Chemie Pelzer GmbH, Brauckstrasse 51, D-58454 Witten (DE). STEINBÜCHEL, Alexander [DE/DE]; HP-Chemie Pelzer GmbH, Brauckstrasse 51, D-58454 Witten (DE).</p> <p>(74) Anwälte: JÖNSSON, Hans-Peter usw.; Deichmannhaus am Dom, D-50667 Köln (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> </p>
<p>(54) Title: COMPOSITES OF POLYHYDROXY FATTY ACIDS AND FIBROUS MATERIALS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERBUNDWERKSTOFFE AUS POLYHYDROXYFETTSÄUREN UND FASERMATERIALIEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the use of a composite of fibrous material and a bonding agent of a polymer of hydroxy fatty acids for the production of shaped members in the car industry, in particular for acoustic damping in the areas of the bonnet, cowl (on both sides), tunnel, door, roof, leg-space, pumps, A-D column and air duct and as an optionally self-supporting base for internal linings, in particular instrument covers, tunnel trims, door trims, seat back covers, A to D column trims and spare wheel covers and also as parts with a dual function in particular in the form of the inside roof lining, the parcel shelf, the packing member, the boot mat or the wheel housing trim.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft Verwendung eines Verbundwerkstoffes aus Fasermaterial und Bindemittel aus einem Polymer von Hydroxyfettsäuren zur Herstellung von Formteilen im Automobilbereich, insbesondere zur akustischen Dämpfung in den Bereichen Motorhaube, Stirnwand (beidseitig), Tunnel, Tür, Dach, Fußraum, Pumpen, A- bis D-Säule und Lüftungskanal und als gegebenenfalls selbsttragende Basis für Innenauskleidungen, insbesondere für Armaturenabdeckungen, Tunnelverkleidungen, Türverkleidungen, Rückenlehnenverkleidungen, A- bis D-Säulenverkleidungen und Reserveradabdeckungen sowie als Teile mit Doppelfunktion insbesondere als Dachhimmel, Hutablage, Füllstück, Kofferraummatte oder Radhausverkleidung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NI	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

VERBUNDWERKSTOFFE AUS POLYHYDROXYFETTSÄUREN UND FASERMATERIALIEN

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Verbundwerkstoffen aus Polyhydroxyfettsäuren als Bindemittel und Fasermaterialien zur Herstellung von Formteilen im Automobilbereich.

Verbundwerkstoffe beispielsweise Textilfaservliese bestehen aus Fasermaterialien und
10 einem verknüpfenden Bindemittel. Als Bindemittel werden dabei hauptsächlich Phenolharze verwendet, deren Umweltverträglichkeit jedoch zweifelhaft ist.

US-5,350,627 A beschreibt die Verwendung von biologisch abbaubaren Polymeren als Bindemittel zur Imprägnierung oder Beschichtung von faserförmigen Geweben. Das
15 resultierende Gewebe ist biologisch abbaubar, so daß die Faser innerhalb des Gewebes einfach wiederverwendet werden kann. Die beschriebenen Bindemittelpolymere weisen Molekulargewichte von mehr als 30000 und insbesondere mehr als 50000 auf und umfassen beispielsweise Polymere von Milchsäure, Glycolsäure, Hydroxybuttersäure und Hydroxyvaleriansäure.

20

In DE 44 16 357 A1 wird eine Wundauflage für medizinische Anwendungen bestehend aus einem Trägermaterial aus pflanzlichen und/oder tierischen Fasern und/oder Fasern aus Polymerstoffen und einem die Fasern im wesentlichen einhüllendes und/oder verstärkendes Polymermaterial beschrieben, wobei das Polymermaterial aus einer
25 Polyhydroxybuttersäure besteht und diese zwischen 1 und 50 Masse-%, bezogen auf die Gesamtmasse der Wundauflage darstellt.

Textilfaservliese sind im Automobilbereich ein häufig verwendeter Konstruktionswerkstoff mit breitem Eigenschaftsspektrum. Beispielsweise wird Phenolharz-gebundenes Textilvlies
30 seit langem unter anderem wegen seiner guten Dämpfungseigenschaften als Werkstoff für tragende und verkleidete Teile (rein oder als Verbundwerkstoff) in der Automobilindustrie im PKW- und LKW-Bau eingesetzt. Als kostengünstige Flachware diente dieses Produkt zunächst und ausschließlich Polsterzwecken. In jüngster Zeit stellte sich dieser Werkstoff jedoch in einer Reihe von Varianten dar, und ist vielseitig

verwendbar. Formteile werden besonders bevorzugt.

Phenolharz-gebundenes Textilvlies ist in Rohdichten von 50 bis 1000 kg/cm³ bei Dicken von 5 bis 30 mm im Handel erhältlich. Es ist als sogenanntes Porenkomposit, bestehend aus drei Phasen (Baumwolle, gehärtetes Phenolharz und Luft) zu beschreiben - ein

5 Konstruktionswerkstoff, dessen Eigenschaftsprofil in weiten Grenzen modifiziert werden kann. Baumwolle hat die Faserform, Phenolharz liegt punktförmig, auch netzflächig als eine Art Matrix vor.

10 Durch besondere Auswahl der Vliesstoffe kann die Akustik und die Festigkeit des Verbundwerkstoffs besonders gesteuert werden. Besonders bevorzugte Materialien zur Herstellung des Vliesstoffes sind Glasfaser-verstärkte oder Glasgitter-verstärkte Faser-materialien, insbesondere Bindemittel enthaltende Textilvliese, vorzugsweise solche, die aus einem Baumwollmischgewebe bestehen. Diese Vliese werden durch Pressen bei

15 erhöhter Temperatur auf die gewünschte Festigkeit gebracht.

Die besonderen Eigenschaften und die Leistungsfähigkeit dieser letztgenannten Produktgruppe erklären sich aus der chemischen und morphologischen Struktur der Baumwolle, sowie dem Duroplastcharakter der ausgehärteten Phenolharze, die

20 üblicherweise als Bindemittel der Baumwollmischgewebevliese eingesetzt werden. Weitere Einflußgrößen sind die Verformbarkeit, die Bügelfähigkeit der Baumwolle, die statistische Bindepunkthäufigkeit und auch die Laminat- und/oder Mantelwirkung der längs von Fasern haftenden und so auch auskondensierten Bindemittelmoleküle.

25 Die Baumwolle übersteht den Fertigungsprozeß praktisch ohne Veränderung ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaftsmerkmale. Sie verleiht dem Produkt besondere Qualitätsmerkmale wie Schall-Absorptionsfähigkeit, gute mechanische Festigkeitswerte, Schlagzähigkeit und Splitterfestigkeit in der Kälte.

30 Besonders bevorzugte Bindemittel für die Vliesstoffe sind ausgewählt aus Phenol-Formaldehyd-Harzen, Epoxidharzen, Polyesterharzen, Polyamidharzen, Polypropylen, Polyethylen und/oder Ethylvinylacetatcopolymeren. Phenolharze haben nach der Härtung

die typischen Duroplasteigenschaften, die sich auf das Fertigprodukt übertragen. Das Textilvlies wird aus der Reißbaumwolle und dem pulvrigen Phenolharz üblicherweise auf trockenem Wege hergestellt. Die Aushärtung erfolgt entweder im Heizkanal oder über das ungehärtete Halbzeug als Zwischenstufe in der Presse. Für die Teile, die im Fahrzeugraum Verwendung finden sollen, wird ausgewähltes Textil eingesetzt.

Weiterhin bekannt sind Holzfaservlieswerkstoffe als ein Holzwerkstoff, zu dessen Herstellung man zerspantes und gehacktes Abfallholz mit Hilfe von Dampfdruck und Wärme zu einem Faserbrei verarbeitet. Dabei werden einige Cellulosebindungen aufgeschlossen. Dem Brei mischt man üblicherweise geringe Mengen an Bindemittel aus Kunstharz (z. B. Phenol-, Alkyl-, Harnstoff-Harze), Flammschutzmittel, Schädlingsbekämpfungsmittel (gegen Insekten und Pilzbefall) und dergleichen bei, formt den Brei auf Formmaschinen zu meist plattenförmigen Faserplatten und entwässert.

Derartige Holzfaservlieswerkstoffe werden als Dämmstoffe gegen Kälte, Wärme und Schall, als Zwischenwände, Tisch- und Fußbodenbeläge usw. auch lackiert und mit Kunstharzfilm beschichtet.

Im Verlauf des Herstellungsprozesses wird das Holz-Fasermaterial geformt, verdichtet und gepreßt. Hierbei wird primär die Verfilzung der Fasern und deren natürliche Bindekraft genutzt. Durch Zugabe von Binde- und Hydrophobierungsmitteln sowie durch thermische und andere Nachbehandlungen lassen sich die Bindekräfte erhöhen. So können die physikalischen und die Festigkeitseigenschaften dem Verwendungszweck angepaßt werden.

25

Nach DIN 68753 unterscheidet man bei Holzfaserwerkstoffen folgende Arten:

harte Holzfaserplatten mit einer Rohdichte von mehr als 800 kg/m³,

mittelharte Holzfaserplatten mit einer Rohdichte von mehr als 350 kg/m³ bis 800 kg/m³ und

30

poröse Holzfaservlieswerkstoffe, auch Isolier- oder Dämmplatten genannt, mit einer Rohdichte von 250 bis 350 kg/m³.

Aus dem Derwent Abstract 90-168 964 und der damit korrespondierenden JP-A-0 211 15 03, sind Formkörper bekannt, die aus Holzfasern und Bindemitteln sowie Glasfasermatten in einem laminierten Zustand bestehen. Der Formkörper wird für Innenauskleidungsteile von Automobilen und elektrischen Schaltschränken verwendet.
5 Dem Material werden gute Dimensionsstabilität und verbesserte Festigkeit sowie akustische Absorptionseigenschaften zugeschrieben.

Das holzartige Formmaterial wird hergestellt durch Zugabe von 5 bis 30 Gew.-% eines phenolischen Bindemittels zur Bindung der holzartigen Fasern. Glasfasermatten werden
10 dadurch erhalten, daß man diese ebenfalls mit einer Phenolharzlösung imprägniert und anschließend trocknet. Die Glasfasermatten werden dann auf einer porösen Platte plaziert und das holzartige Formmaterial auf die Matte aufgesprüht. Nachdem das holzartige Formmaterial die erwünschte Dicke erreicht hat, wird das Aufsprühen gestoppt und eine Platte aufgebracht, um ein Verbundmaterial zu erhalten. Dieses wird in einem
15 Formwerkzeug unter Druck zu einem Kraftfahrzeughimmel-Grundmaterial geformt.

Weiterhin ist von einer großen Zahl von Bakterien bekannt, daß sie unter geeigneten Wachstumsbedingungen, bei denen ein Überschuß einer Kohlenstoffquelle, gleichzeitig aber ein Mangel an einem essentiellen Nährsalz im Medium vorliegt, intrazellulär große
20 Mengen Polyhydroxyfettsäuren (PHF) speichern. Eine Übersicht ist in A. Steinbüchel, "Polyhydroxyalkanoic acids" In: D. Byrom, Hrsg., Biomaterials, Macmillan Publishers Ltd., Basingstoke, S. 123-213 (1991) gegeben. Diese Polyhydroxyfettsäuren stellen in der Regel lineare Polyester aus 3-Hydroxyfettsäuren dar, wobei in Einzelfällen auch 4-Hydroxy- oder 5-Hydroxyfettsäuremonomere gefunden werden. Die Eigenschaften der
25 bakteriellen Polymere hängen entscheidend von der Länge der Seitenkette der Monomere und von den Monomerkombinationen ab. So ist Poly-3-hydroxybuttersäure (PHB) hart und spröde, während Poly-3-hydroxydekansäure (PHD) gummiartig verformbar ist. Meist bestehen die Polyester aus Einheiten mehrerer Monomeren mit unterschiedlichen Zusammensetzungen. Bei einigen Polymeren, wie beispielsweise Copoly-3-
30 hydroxybuttersäure-3-hydroxyvaleriansäure (PHB/HV), kann die Stoffmengen-Zusammensetzung bei der mikrobiologischen Herstellung durch die Zugabe von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen gesteuert werden. In anderen Polymeren, wie PHD

(bestehend aus 30 mol% 3-Hydroxyoctanoat, 50 mol% 3-Hydroxydecanoat, 10 mol% 3-Hydroxydodecanoat und weiteren gesättigten und ungesättigten 3-Hydroxyfettsäuren) sind der Variabilität teilweise enge Grenzen gesetzt. Technische Anwendungen dieser Polymere sind jedoch nicht vorhanden.

5

Das Problem der vorliegenden Erfindung bestand darin, die genannten und gegebenenfalls neuen Polyhydroxyfettsäuren einer neuen Verwendung im Automobilbereich in Form eines Bindemittels für Verbundwerkstoffe zuzuführen, die gegenüber Phenolharzen eine bessere biologische Abbaubarkeit zeigen, aus natürlichen
10 Rohstoffen leicht herstellbar ist und eine gleiche oder erhöhte mechanische Stabilität des Verbundwerkstoffes gegenüber bekannten Werkstoffen des Automobilbereichs gewährleistet.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß sich Polymere von Hydroxyfettsäuren als
15 Bindemittel für Verbundwerkstoffe im Automobilbereich eignen.

Gegenstand der Erfindung ist demgemäß in einer ersten Ausführungsform die Verwendung eines Verbundwerkstoffes aus Fasermaterial und Bindemittel aus einem Polymer von Hydroxyfettsäuren zur Herstellung von Formteilen im Automobilbereich,
20 insbesondere zu akustischen Dämpfung in den Bereichen Motorhaube, Stirnwand (beidseitig), Tunnel, Tür, Dach, Fußraum, Pumpen, A- bis D-Säule und Lüftungskanal und als gegebenenfalls selbsttragende Basis für Innenauskleidungen, insbesondere für Armaturenabdeckungen, Tunnelverkleidungen, Türverkleidungen, Rückenlehnenverkleidungen, A-Bis D-Säulenverkleidungen und Reserveradabdeckungen sowie
25 als Teile mit Doppelfunktion insbesondere als Dachhimmel, Hutablage, Füllstück, Kofferraummatte oder Radhausverkleidung.

Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist es möglich, neue biologisch abbaubare Verbundwerkstoffe für den Automobilbereich zur Verfügung zu stellen.

30

Die Verbundwerkstoffe sind durch die besonderen Eigenschaften wie die hohe Steifigkeit zur Herstellung von Textilfaservliesen, insbesondere Glasfaser-verstärkten oder

Glasgitter-verstärkten Fasermaterialien und Baumwollvliesen besonderes geeignet. Hier ist ein teilweise oder vollständiger Ersatz der üblicherweise eingesetzten Phenolharz-bindemittel möglich.

- 5 Das eingesetzte Bindemittel verleiht den Verbundwerkstoffen akustische Eigenschaften, die sich aus der Porosität des Materials ergeben, wodurch den Materialien eine besondere Eignung für den Automobilbereich zukommt.

Verbundwerkstoffe im Sinne der vorliegenden Erfindung enthalten vorzugsweise
10 Naturfasern, insbesondere ausgewählt aus Lachs, Sisal, Hanf, Holzwolle, Holzschliff, Holzfasern, Kokosfasern, Watte, Heu, Stroh, Sägemehl, Hobelspänen, Kiefernspänen, Spelzen, Samenresten, Haferflocken, Getreide, Kleie, Papierstreifen und Baumwollereeste aber auch Kunstfasern, wie Polybutylenterephthalate, Polyethylenterephthalate, Nylon 6, Nylon 66, Nylon 12, Viskose oder Rayon als Textilfaser.

15

Die Polymere von Hydroxyfettsäuren, die gemäß der vorliegenden Erfindung als Bindemittel in Verbundwerkstoffen eingesetzt werden, leiten sich vorzugsweise von gesättigten oder ungesättigten 3-Hydroxyfettsäuren mit 4 bis 16 Kohlenstoffatomen im Fettsäurerest ab. Wird die Kettenlänge des Fettsäurerestes beispielsweise durch die
20 biologischen Bedingungen bei der Herstellung der Polymeren zu kurz gewählt, so wird das Polymer zu spröde, während ein langer Kohlenstoffrest dazu führt, daß die Festigkeit des Materials abnimmt.

Neben Homopolymeren aus einem Monomer von Hydroxyfettsäuren ist es beispielsweise
25 durch die Auswahl der mikrobiologischen Bedingungen möglich, Gemische von Polyhydroxyfettsäuren und somit auch Copolymere oder auch Terpolymere zu erhalten.

Besonders bevorzugt besteht das Polymer von Hydroxyfettsäuren aus Poly-3-hydroxybuttersäure (PHB), Copolymer-poly-3-hydroxybuttersäure-3-hydroxyvaleriansäure
30 (PHB/HV) in etwa äquimolen Anteilen und Poly-3-hydroxydodecansäure oder Gemischen derselben.

Die Art und Menge der einzusetzenden Bindemittel wird im wesentlichen durch den Anwendungszweck des Verbundwerkstoffes bestimmt. So wird im allgemeinen der Einsatz von 5 bis 50 Gew.-%, insbesondere 20 bis 40 Gew.-% bezogen auf den Verbundwerkstoff sinnvoll sein. Für den Fall, daß noch weitere an sich übliche Bindemittel in dem
5 Verbundwerkstoff eingesetzt werden sollen, ist es jedoch möglich, die Menge des erfindungsgemäßen Bindemittels zu vermindern.

Der Kern der vorliegenden Erfindung besteht in der besonderen Eignung der Polymeren von Hydroxyfettsäuren zur Herstellung von Verbundwerkstoffen im Automobilbereich.
10 Besonders bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Verbundwerkstoffe zur akustischen Dämpfung in Bereichen Motorhaube, Stirnwand (beidseitig), Tunnel, Tür, Dach, Fußraum und dem Lüftungskanal, sowie gegebenenfalls als selbsttragende Basis für Innenauskleidungen, insbesondere für Amaturenabdeckungen, Tunnenvorverkleidungen, Türverkleidungen, Rücklehnenverkleidungen und Reserveabdeckungen sowie für Teile
15 mit Doppelfunktion, insbesondere als Dachhimmel, Hutablage, Füllstück, Kofferraummatte und Radhausverkleidung eingesetzt.

Die genannten Verbundwerkstoffe können dadurch erhalten werden, daß man das Fasermaterial mit dem Bindemittel in Kontakt bringt und anschließend zu dem
20 Verbundwerkstoff verpreßt. Hierbei werden die Fasermaterialien mit den Bindemitteln in geeigneter Weise kombiniert und durch Verpreßen bei einer Temperatur im Bereich der Raumtemperatur oder oberhalb des Schmelzbereiches des Bindemittels, jedoch unterhalb des Zersetzungsbereichs des Bindemittels erhalten. Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Temperaturbereich von 120 bis 250°C,
25 insbesondere 180 bis 250°C, da bisher im Stand der Technik verwendete Verbundwerkstoffe, insbesondere Textilfaservliese im Automobilbereich auch bei einer derartigen Temperatur gepreßt werden.

Die mikrobiologische Herstellung der Polymeren von Hydroxyfettsäuren mittels
30 Mikroorganismen ist an sich bekannt. Hierzu ist es möglich, die im Handel frei zugängliche Mikroorganismen einzusetzen und durch geeignete Verfahren zu vermehren.

Eine Möglichkeit des Herstellungsverfahrens der Verbundwerkstoffe besteht darin, daß man das Fasermaterial mit isoliertem und gereinigtem Polymer von Hydroxyfettsäuren vermischt und bei entsprechender Temperaturführung verpreßt. Hierbei wird ein besonders reiner, optisch ansprechender Verbundwerkstoff erhalten, der im Sichtbereich
5 gegebenenfalls ohne Kaschierung eingesetzt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung der Verbundmaterialien besteht darin, das Fasermaterial mit getrockneten Polymer von Hydroxyfettsäuren enthaltenen Mikroorganismen oder einer Paste derselben zu vermischen. Hier wird also der
10 Mikroorganismus nicht von den Polymeren von Hydroxyfettsäuren befreit, sondern zusammen mit diesem in dem Verbundwerkstoff eingearbeitet.

Eine erfindungsgemäße Variante des Herstellungsverfahrens besteht darin, die Polymere von Hydroxyfettsäuren produzierenden Mikroorganismen in Anwesenheit des
15 Fasermaterials der herzustellenden Verbundwerkstoffe und einer weiteren Kohlenstoffquelle anzuziehen, die Bakterien samt den Fasern zu ernten und in getrocknetem oder feuchten Zustand, gegebenenfalls unter Einsatz weiteren Fasermaterials und Verbundwerkstoffen zu pressen. Bei dieser Ausführungsform wird also das Fasermaterial selbst teilweise als Nahrungsmittel für die Mikroorganismen
20 eingesetzt. Bei dieser Verfahrensweise wurde die Freisetzung von PHF-Granalien aus Zellen von *alcaligenes eutrophus* in Gegenwart feinverteilt vorliegender Cellulosefasern beobachtet.

Eine weitere erfindungsgemäße Möglichkeit der Herstellung der Verbundmaterialien besteht darin, ohne weitere Kohlenstoffquelle die Mikroorganismen anzuziehen, wobei
25 das Fasermaterial allein als Kohlenstoffquelle dient.

Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein PHF-Synthesegen-
exprimierender-rekombinanter Mikroorganismus eingesetzt.

30

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiele

5

Beispiel 1:

Die Fähigkeit zur Herstellung Poly-3-hydroxydekansäure (PHD) ist auf die taxonomische Gruppe der Pseudomonaden beschränkt. Da jedoch Polyester wie PHD oder das nahe verwandte Poly-3-hydroxyoctanoat (PHO) bislang nicht in größeren Mengen hergestellt wurden, mußte zunächst ein geeigneter Stamm für die Produktion gefunden werden. Hierzu wurden zunächst im Handel frei erhältliche Stämme der Gattung Pseudomonas auf die Verwertung von preiswerten Substraten wie Gluconat, Glucose oder Saccharose (Haushaltszucker) sowohl auf festen Medien, wie auch in Flüssigkultur getestet (Tab.1). Zur Kultivierung wurde ein definiertes Mineralmedium nach Schlegel et al. (1961) mit der
10
15 im folgendem aufgeführten Zusammensetzung eingesetzt.

Die nachfolgend in der Tabelle genannten Stämme sind der Öffentlichkeit frei zugänglich, da diese bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig geführt werden. Anstelle der genannten Stämme führen auch andere
20 hinterlegte Stämme zu vergleichbaren Ergebnissen.

Tabelle 1

Fermentationsbedingungen zur Herstellung von PHD in unterschiedlichen Pseudomonas Species

	Organismus	Substrat ^{a)}	Medium ^{b)}	Dauer (h)	Kulturvolumen: (l)	Trockengewicht: (g /l)	PH ^{c)} (%TM)	PHF(g/l)
1	P. putida KT2442	10 % Gluconat	30 x MM	72	7	18,0	2,6	0,4
2	P. mendocina (DSM 50017)	10 % Gluconat	2xNH ₄ Cl 3xMg/Ca/F e	93	30	8,5	47,5	4,0
3	P. citronellolis (DSM 50332)	6 % Gluconat	3xSL6 2xNH ₄ Cl 2xMg/Ca/F e	75	9	6,9	85,7	5,8
4	P. citronellolis (DSM 50332)	3 % Gluconat	1,5xNH ₄ Cl 2xMg/Ca/F e	95	30	3,2	73,6	2,3
5	P. sp. (DSM 1650)	4 % Saccharose	2xSL6	48	8	3,0	27,5	0,8
6	P. putida KT2442	4 % Gluconat	1xMM	24	250	3,4	62,1	2,1
7	P. putida KT2442	4 % Gluconat	1xMM 1,5xNH ₄ Cl	36	250	4,4	72,8	3,2
8	A. eutrophus H16 (DSM 428)	4 % Gluconat	2 x MM	43	250	9,4	73,2	6,9
9	A. eutrophus H16 (DSM 428)	2 % Gluconat 1 % Valerat	2xMM	58	250	5,6	69,1	3,9

a). Die Substrate wurden in 2 %(w/v)-Portionen zugegeben.

b), Die in der Literatur (Schlegel et.al. 1961) angegebene Menge der betreffenden Substanz wird als 1 x gerechnet, SL, Spurenelementlösung SL6. Die Abkürzungen der Substanzen beziehen sich auf die entsprechenden Salze (s. Medium). ZTM, Zelltrockenmasse.

5

Mineralmedium (Schlegel et al. 1961):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O} = 9,00 \text{ g}$

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1,50 \text{ g}$

$\text{NH}_4\text{Cl} = 1,00 \text{ g}$

10 $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 0,20 \text{ g}$

$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O} = 0,02 \text{ g}$

$\text{Fe(III)NH}_4\text{-Citrat} = 1,20 \text{ mg}$

SL6 (Pfennig, N. 1974) = 0,10 ml

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}} = \text{ad } 1000 \text{ ml, pH } 6,9$

15

Bei den Versuchen wurde insbesondere auf die Schnelligkeit des Wachstums und der Polymerspeicherung sowie auf verminderte Schaumbildung geachtet. Unter zusätzlicher Berücksichtigung von Literaturangaben (Haywood G.W. Anderson, A.J. & Dawes, E.A. (1989b) "A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria"

20 Biotechnol. Lett. 11, 471-476;

Huisman, G.W., De Leeuw, O., Eggink, G. & Witholt, B. (1989) "Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads" Appl. Environ. Microbiol. 55, 1949-1954; Timm, A. & Steinbüchel, A. (1990) "Formation of polyesters consisting of medium-chainlength 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by

25 *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads" Appl. Environ. 56, 3360-3367) wurden insbesondere die Stämme *P.putida* KT 2442, *P. citronellolis*, *P. mendocina*, *P.sp.* 15a und *P.sp.* 45C als mögliche Mikroorganismen für die Herstellung von PHF ausgewählt. In parallel durchgeführten Versuchen, in denen Glucose beziehungsweise Gluconat als Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde, zeigte sich, daß Gluconat in der Regel
30 das bessere Substrat für die Synthese von PHF darstellte.

Vier dieser Stämme wurden in Probefermentationen im 10 l- beziehungsweise 30 l-

Maßstab angezogen (Tabelle 1). Hierbei erwies sich ein Herstellungsprozeß unter Verwendung von *P. putida* KT2442 und Gluconat als Kohlenstoffquelle zunächst als günstig, da der Polymergehalt in diesem Stamm schon zu einem frühen Zeitpunkt im Bereich der logarithmischen Wachstumsphase sehr hoch war. Da die anderen
5 untersuchten Stämme erst zu einem späteren Verlauf des Wachstums PHF synthetisierten, konnte der Prozeß unter Verwendung von *P. putida* KT2442 mit einem weitaus geringerem Zeitaufwand durchgeführt werden. Die unter 2 und 3 aufgeführten Fermentationen der Tabelle 1 mit *P. medocina* und *P. citronellolis* erbrachten zwar höhere Ausbeuten an Zelltrockenmasse beziehungsweise PHF pro Liter Kultur, benötigten jedoch
10 neben dem höheren Zeitaufwand größere Mengen an Nährsalzen und Gluconat. Auch *P. putida* KT2442 konnte zu höheren Zelldichten als die unter 5 und 6 (Tabelle 1) beschriebenen angezogen werden, wie Fermentation 1 (Tabelle 1) zeigte.

Schwierigkeiten bei der Fermentationen mit Pseudomonaden lagen in einer nahezu nicht
15 kontrollierbaren Schaumbildung, wenn der pH-Wert des Mediums parallel mit dem Verbrauch von Natriumgluconat in einen alkalischen pH-Wertbereich übergang. Es war möglich, das Schäumen der Kultur, das zu einem beträchtlichen Verlust der gebildeten Zellmasse durch Austragen der Biomasse aus dem Bioreaktor führte, durch Nachtitrieren mit konzentrierter Phosphorsäure, die Zugabe von großen Mengen Entschäumern
20 (Polypropylenglycol, unverdünnt) und eine geringere Umdrehungszahl des Rührers zu vermindern. Die Maßnahmen bergen jedoch die Gefahr der Schädigung der Bakterien durch zu hohe Chemikalienkonzentrationen. Geringe Umdrehungszahlen des Rührwerkes führen zu geringen Sauerstoffkonzentrationen, die den Speicherungsprozeß von PHD verlangsamen oder verhindern.

25

Beispiel 2:

Zur Gewinnung von PHD wurden ca. 1 kg lyophilisierte Zellen von *P. putida* KT2442 aus den Anzuchten Nr. 6 und 7 (Tabelle 1) im Soxhlet-Extraktor mit 7,5 l Chloroform sieben
30 Tage extrahiert. Die PHF-haltige Chloroform-Lösung wurde im Rotationsverdampfer eingeeengt und gemäß Lageveen, R.G. Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. & Witholt, B., (1988) "Formation of polyesters by pseudomonas oleovorans:

effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates", Appl. Environ. Microbiol. 54,2924-2932, das Polymer durch Fällung im zehnfachen Volumen Ethanol isoliert. Es resultierten ca. 360 g gereinigtes PHD, was einer Ausbeute von ca. 55 % des möglichen Wertes entsprach.

5

Als günstigste Menge zum Pressen von Fasermaterialien wurden 3 g ermittelt, da mit dieser Menge die Kapazität der Preßzelle gut ausgenutzt war und ein Preßling genügender Stärke resultierte. Aufgrund der gummiartigen Konsistenz des PHD wurde, um eine ausreichende Verteilung des Polymers innerhalb des Fasermaterials zu gewährleisten, PHD in Chloroform gelöst und mit dieser Lösung gleichmäßig alle Fasern benetzt.

10

Ein Volumen von 20 ml Chloroform (im Falle von Sisal 5 ml, bei Holzwolle und Hanf 10 ml) reichten aus, um von 3 g Fasermaterial vollständig aufgenommen zu werden. Es wurden daher Lösungen von 0,5 bis 20 % (w/v) PHF (PHB- siehe Tabelle 2, PHD - siehe Tabelle 3, Gemische von PHF - siehe Tabelle 4) Chloroform hergestellt, mit dem Fasermaterial versetzt und das Lösungsmittel durch Verdunsten über Nacht entfernt. Die PHD-benetzten Fasern wurden dann unter den in Tabellen 2 bis 5 angegebenen Bedingungen gepreßt. So erwiesen sich 2 bis 10 %ige PHD-Lösungen offensichtlich als die am besten geeigneten Konzentrationen zur Herstellung von Verbundmaterialien aus PHD und Baumwollresten, Flachs oder Sisal oder Hanf. Die Preßlinge besaßen damit PHD-Anteile zwischen 11 und 40 %. Bei der Verwendung von Watte trat das Polymer schon bei geringen Konzentration aus der Zelle aus und Polymeranteile zwischen 6 und 14 % erschienen hier als günstig. Die Ergebnisse sind in Tabellen 2 bis 5 zusammengefaßt.

20

25

30

Tabelle 2

Herstellung von Probepreßlingen aus isoliertem PHB (bestehend aus 100 mol% polymerem 3-Hydroxybutyrat) und verschiedenen Fasermaterialien

Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHB (g)	Lösung (%)	Anteil PHB (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
Baumwollreste								
3	0	0,23	-	7,1	200	5	180	- ohne Lösungsmittel
3	0	0,30	-	9,1	200	5	180	- ohne Lösungsmittel
3	0	0,45	-	13,1	200	5	180	+/- ohne Lösungsmittel
3	0	0,60	-	16,7	200	5	180	+/- ohne Lösungsmittel
3	20''	0,5	2,5	14,3	200	5	180	wäßr. Suspension
3	20''	1,0	5,0	25,0	200	5	180	wäßr. Suspension
3	0	0	-	0	200	5	180	- Blindprobe
3	20	0,4	2,0	11,8	200	5	180	++
3	20	1,0	5,0	25,0	200	5	180	+++
3	20	1,5	7,5	33,3	200	5	180	+++ zuviel Polymer
3	20	2,0	10,0	40,0	200	5	180	+++ zuviel Polymer
3	20	0,05	0,25	1,6	200	5	180	-
3	20	0,1	0,5	3,2	200	5	180	+/-

Tabelle 2 (Fortsetzung)

	Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHB (g)	Lösung (%)	Anteil PHB (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
5	3	20	0,2	1,0	6,2	200	5	180	+/-
	3	20	0,3	1,5	9,1	200	5	180	+
	Flachs								
	3	20	0,33	1,65	9,9	200	5	180	++
10	3	20	0,75	3,75	20,0	200	5	180	+++
	Sisal								
	3	5	0,33	6,6	9,9	200	5	180	++
	3	5	0,75	14,0	20,0	200	5	180	+++
	Hanf								
15	3	10	0,33	3,3	9,9	200	5	180	++
	3	10	0,75	7,5	20,0	200	5	180	+++
	Holzwolle								
	3	10	0,33	3,3	9,9	200	5	180	++
	3	10	0,75	7,5	20,0	200	5	180	+++
20	Watte								
	3	20	0,33	1,65	9,9	200	5	180	++
	3	20	0,75	3,75	20,0	200	5	180	+++
	Heu								
	3	5	0,33	6,6	9,9	200	5	180	++
25	3	5	0,75	14,0	20,0	200	5	180	+++
	Stroh								
	3	5	0,33	6,6	9,9	200	5	180	++
	3	5	0,75	14,0	20,0	200	5	180	+++

30

Tabelle 2 (Fortsetzung)

	Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHB (g)	Lösung (%)	Anteil PHB (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
	Sägemehl								
5	6	20	0,66	3,3	9,9	200	5	180	++
	6	20	1,5	7,5	20,0	200	5	180	+++
	Spelzen								
	6	20	0,66	3,3	9,9	200	5	180	++
	6	20	1,5	7,5	20,0	200	5	180	+++
10	Hobelspäne								
	6	20	0,66	3,3	9,9	200	5	180	++
	6	20	1,5	7,5	20,0	200	5	180	+++
	Kiefernspäne								
	6	20	0,66	3,3	9,9	200	5	180	++
15	6	20	1,5	7,5	20,0	200	5	180	+++
	Samenreste								
	12	10	1,32	13,2	9,9	200	5	180	- Öl tritt aus
	Haferflocken								
	12	10	1,32	13,2	9,9	200	5	180	-
20	Roggen								
	12	10	1,32	13,2	9,9	200	5	180	-
	Kleie								
	6	10	0,66	6,6	9,9	200	5	180	+
	Papierstreifen								
25	6	10	0,66	6,6	9,9	200	5	180	++
	6	10	1,5	15,0	20,0	200	5	180	+++

Bewertung: - = ungeeignete; + = geeignete; ++ = gut geeignete; +++ = sehr gut geeignete;
 30 - Kombination von Fasermaterial und Polyhydroxyfettsäure(n) in Preßlinge
 einheitlicher Verteilung beider Komponenten und mit hoher Festigkeit herstellbar
), Lösungsmittel Wasser

Tabelle 3

Herstellung von Probepreßlingen aus isoliertem PHD (bestehend aus 3 mol% polymerem 3-Hydroxyhexanoat, 20 mol% polymerem 3-Hydroxyoctanoat, 75 mol% polymerem 3-Hydroxydecanoat und 2 mol% polymerem 3-Hydroxydodecanoat) und verschiedenen Fasermaterialien

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

	Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHD (g)	Lösung g (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
10	Baumwollreste								
	1	0	1,0	-	50,0	200	5	75	- ohne Lösungsmittel
	3	0	0,5	-	14,3	200	5	75	- ohne Lösungsmittel
15	3	20	0	0	0	200	5	75	- Blindprobe
	3	20	0,1	0,5	3,2	200	5	75	- zuwenig Polymer
	3	20	0,2	1,0	6,2	200	5	75	+/- zuwenig Polymer
	3	20	0,4	2,0	11,8	200	5	75	++
	3	20	1,0	5,0	25,0	200	5	75	+++
20	3	20	1,5	7,5	33,3	200	5	75	+++
	3	20	2,0	10,0	40,0	200	5	75	+++
	3	20	3,0	15,0	50,0	200	5	75	+++ zuviel Polymer
	3	20	4,0	20,0	57,1	200	5	75	+++ zuviel Polymer

25

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHD (g)	Lösung (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
Flachs								
3	20	0	0	0	200	5	75	- Blindprobe
3	20	0,1	0,5	3,2	200	5	75	- zuwenig Polymer
3	20	0,2	1,0	6,2	200	5	75	+/- zuwenig Polymer
3	20	0,4	2,0	11,8	200	5	75	++
3	20	1,0	5,0	25,0	200	5	75	+++
3	20	1,5	7,5	33,3	200	5	75	+++
3	20	2,0	10,0	40,0	200	5	75	+++
3	20	3,0	15,0	50,0	200	5	75	+++ zuviel Polymer
3	20	4,0	20,0	57,1	200	5	75	+++ zuviel Polymer
Sisal								
3	5	0	0	0	200	5	75	- Blindprobe
3	5	0,1	2	3,2	200	5	75	-
3	5	0,25	5	7,7	200	5	75	+/-
3	5	0,37	7,5	11,0	200	5	75	+
3	5	0,5	10	14,3	200	5	75	+++
3	5	0,75	15	20,0	200	5	75	+++
3	5	1,0	20	25,0	200	5	75	+++

Tabelle 3 (Fortsetzung)

5

10

15

20

25

30

Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHD (g)	Lösung (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
Hanf								
3	10	0	0	0	200	5	75	- Blindprobe
3	10	0,2	2	6,2	200	5	75	+/-
3	10	0,5	5	14,3	200	5	75	+++
3	10	0,75	7,5	20,0	200	5	75	+++
3	10	1,0	10	25,0	200	5	75	+++
Holzwolle								
3	10	0	0	0	200	5	75	- Blindprobe
3	10	0,2	2	6,2	200	5	75	-
3	10	0,5	5	14,3	200	5	75	+
3	10	0,75	7,5	20,0	200	5	75	++
3	10	1,0	10	25,0	200	5	75	+++
Watte								
3	20	0	0	0	200	5	75	- Blindprobe
3	20	0,4	2	11,8	200	5	75	++
3	20	1,0	5	25,0	200	5	75	+++
3	20	2,0	10	40,0	200	5	75	+++ zuviel Polymer
3	20	1,5	7,5	33,3	200	5	75	+++ zuviel Polymer
Heu								
3	5	0			200	5	75	- Blindprobe
3	5	0,37	7,4	11,0	200	5	75	+-
3	5	0,5	10	14,3	200	5	75	+++

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHD (g)	Lösung (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
5	Stroh								
	3	5				200	5	75	- Blindprobe
	3	5	0,37	7,4	11,0	200	5	75	+
	3	5	0,5	10	14,3	200	5	75	+++
10	Sägemehl								
	3	10	0		0	200	5	75	- Blindprobe
	3	10	0,33	3,3	9,9	200	5	75	+/-
	3	10	0,75	7,5	20,0	200	5	75	+
	6	20	0,66	3,3	9,9	200	5	75	-
15	6	20	1,5	7,5	20,0	200	5	75	++
	Hobelspäne								
	3	10	0		0	200	5	75	- Blindprobe
	3	10	0,33	3,3	9,9	200	5	75	+/-
	3	10	0,75	7,5	20,0	200	5	75	++
20	6	20	0,66	3,3	9,9	200	5	75	++
	6	20	1,5	7,5	20,0	200	5	75	++
	Kiefernspäne								
	3	10	0		0	200	5	75	- Blindprobe
	3	10	0,33	3,3	9,9	200	5	75	+/-
25	3	10	0,75	7,5	20,0	200	5	75	+
	6	20	0,66	3,3	9,9	200	5	75	++
	6	20	1,5	7,5	20,0	200	5	75	++

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHD (g)	Lösung (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
5	Spelzen								
	3	10	0		0	200	5	75	- Blindprobe
	3	10	0,33	3,3	9,9	200	5	75	+/-
	3	10	0,75	7,5	20,0	200	5	75	+
	6	20	0,66	3,3	9,9	200	5	75	++
10	6	20	1,50	7,5	20,0	200	5	75	++
	Samenreste								
	12	5	0		0	200	5	75	- Blindprobe
	12	5	0,33	6,6	2,7	200	5	75	- Öl tritt aus
	12	5	0,75	15,0	5,9	200	5	75	- Öl tritt aus
15	12	10	3,00	30,0	20,0	200	5	75	+/- Öl tritt aus
	12	10	1,37	13,7	10,2	200	5	75	+/- Öl tritt aus
	Haferflocken								
	12	10	0		0	200	5	75	- Blindprobe
	12	10	0,33	3,3	2,7	200	5	75	-
20	12	10	0,75	7,5	5,9	200	5	75	+/-
	12	10	1,37	13,7	10,2	200	5	75	+/-
	12	10	3,00	30,0	20,0	200	5	75	+
	Roggen								
	12	10	0		0	200	5	75	- Blindprobe
25	12	10	1,37	13,7	10,2	200	5	75	+/-
	12	10	3,00	30,0	20,0	200	5	75	+/-

Tabelle 3 (Fortsetzung)

5	Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHD (g)	Lösung (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
	Kleie								
	6	10	0		0	200	5	75	- Blindprobe
	6	10	0,66	6,6	9,9	200	5	75	++
	6	10	1,50	15,0	20,0	200	5	75	+/-
10	Papierstreifen								
	6	10	0		0	200	5	75	- Blindprobe
	6	10	0,66	6,6	9,9	200	5	75	+/-
	6	10	1,50	15,0	20,0	200	5	75	++

15

Tabelle 4

Herstellung von Probepresslingen aus Polymergemischen (PHB/HV enthaltend 8 % HV)
von Polyhydroxyfettsäuren und Baumwollresten

5

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHF (g)	Lösung (%)	Anteil Polymer (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
3	0	0,23	-	7,1	200	5	150	+/- ohne Lösungsmittel
3	0	0,30	-	9,1	200	5	150	+ ohne Lösungsmittel
3	0	0,45	-	13,0	200	5	150	+++ ohne Lösungsmittel
3	0	0,60	-	16,7	200	5	150	+++ ohne Lösungsmittel
3	20	0,4	2,0	11,8	200	5	150	++
3	20	1,0	5,0	25,0	200	5	150	+++
3	20	1,5	7,5	33,3	200	5	150	+++
3	20	2,0	10,0	40,0	200	5	150	+++ zuviel Polymer
3	20	0,05	0,25	1,6	200	5	150	+/-
3	20	0,1	0,5	3,2	200	5	150	+/-
3	20	0,2	1,0	6,2	200	5	150	+
3	20	0,3	1,5	9,1	200	5	150	++
3	20''	0,5	-	14,3	200	5	150	++ wäBr. Suspension
3	20''	1,0	-	25,0	200	5	150	+++ wäBr. Suspension

25

Tabelle 5

Herstellung von Probepresslingen aus verschiedenen Polymeren und Baumwollresten und anderen Naturstoffen

5

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

Fasermaterial (g)	CHCl ₃ (ml)	PHD (g)	Lösung g (%)	Anteil Polymer (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
Biopol ¹¹								
3	20	0,4	2	13,3	200	5	150	+
3	20	1,0	5	33,3	200	5	150	+++
3	20	1,5	7,5	50,0	200	5	150	+++ zuviel Polymer
3	20	2,0	10	66,7	200	5	150	+++ zuviel Polymer
Mehl								
3	20 ¹¹	0,33	1,65	9,9	200	5	100	+/-
3	20 ¹¹	0,75	3,75	20,0	200	5	100	+/-
3	20 ¹¹	0,33	1,65	9,9	200	5	180	+
3	20 ¹¹	0,75	3,75	20,0	200	5	180	++
Schrot								
3	20 ¹¹	0,33	1,65	9,9	200	5	100	+/-
3	20 ¹¹	0,75	3,75	20,0	200	5	100	+/-
3	20 ¹¹	0,33	1,65	9,9	200	5	180	++
3	20 ¹¹	0,75	3,75	20,0	200	5	180	+++
Stärke								
3	20 ¹¹	0,33	1,65	9,9	200	5	100	+/-
3	20 ¹¹	0,75	3,75	20,0	200	5	100	+/-
3	20 ¹¹	0,33	1,65	9,9	200	5	180	+
3	20 ¹¹	0,75	3,75	20,0	200	5	180	++

30 ¹¹: analog Tabelle 4 enthaltend 18 % HV

PHD, PHB/HV mit einem Anteil von 8 mol% 3-Hydroxyvaleriansäure (3HV) und "Biopol"
eines Naturstoffpolymeren mit einem Anteil von 18 mol% 3HV wurden ebenfalls in 20 ml

Chloroform aufgenommen. Hierbei resultierten Suspensionen, da die Polymere schwer löslich sind.

Beispiel 3:

- 5 Um Bakterien mit einem signifikanten Anteil PHF an der Zelltrockenmasse direkt ohne Isolierung des PHF zusammen mit Fasermaterial zu verpressen, wurden getrocknete Zellen von *P. putida* aus Fermentation 6 (Tabelle 1) mit einem Anteil von 62 % Polymer an der Zelltrockenmasse, im Mörser zu einem Pulver zermahlen. Dieses Pulver wurde in unterschiedlichen Mengen so gut wie möglich unter die Fasern gemischt und gepreßt.
- 10 Die resultierenden Preßlinge zeigten eindeutig, daß in Zonen mit viel Zellmaterial ein Zusammenhalten gewährleistet war, während in Bereichen ohne Zellmaterial das Material sehr locker war.

- Um eine bessere Verteilung zu erreichen, wurden entsprechende Mengen Zellmaterial
- 15 in Chloroform suspendiert, ca. 1 Stunde auf einem Rotationschüttler inkubiert und mit den Fasern vermischt. Nach Abdampfen des Chloroforms wurde das Gemisch gepreßt. Auch hier zeigten die Preßlinge keine homogene Verteilung der Zellen wodurch kein ausreichender Zusammenhalt des Material gewährleistet war.

- 20 In einem weiteren Versuchsansatz wurden die entsprechenden Mengen getrockneter Zellen in Wasser resuspendiert, ca. 1 Stunde auf dem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend mit dem Fasermaterial vermischt. Dieses Gemisch wurde dann über Nacht gefriergetrocknet und anschließend gepreßt. Die resultierenden Preßlinge zeigten eine homogene Verteilung von Zellen und Polymer, so daß dieses Verfahren als besonders
- 25 geeignet zur Herstellung von Verbundmaterialien erscheint. Ein Mischungsverhältnis von 9 bis 30 % Zellen, entsprechend einem Polymeranteil von 6 bis 24 %, erschien für die Preßlinge als günstig. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6

Herstellung von Probepresslingen aus verschiedenen Fasermaterialien und getrockneten Zellen, die PHF enthalten. (Fermentation 14: PHB-Gehalt 73 %; Zusammensetzung: 10 mol% 3-Hydroxybutyrat).

Die Zellen wurden in dem angegebenen Volumen (ml) Wasser resuspendiert, mit den Fasern vermischt und lyophilisiert.

10 Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

Fasermaterial (g/ml)	Zellen (g)	PHB (g)	Anteil Zellen (%)	Anteil PHB (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
Baumwolle								
3	0,15	0,11	4,8	3,5	200	10	180	+
3	0,23	0,17	7,1	5,3	200	10	180	++
3	0,3	0,22	9,1	6,7	200	10	180	++
3	0,45	0,33	13,2	9,6	200	10	180	+++
Flachs								
3/20	0,50	0,36	14,3	10,4	200	3	180	++
3/20	1,16	0,85	27,9	20,4	200	3	180	+++
Sisal								
3/5	0,50	0,36	14,3	10,4	200	3	180	++
3/5	1,16	0,85	27,9	20,4	200	3	180	+++
Hanf								
3/10	0,50	0,36	14,3	10,4	200	3	180	++
3/10	1,16	0,85	27,9	20,4	200	3	180	+++

Tabelle 6 (Fortsetzung)

	Fasermaterial (g/ml)	Zellen (g)	PHB (g)	Anteil Zellen (%)	Anteil PHB (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
	Holzwolle								
5	3/10	0,50	0,36	14,3	10,4	200	3	180	++
	3/10	1,16	0,85	27,9	20,4	200	3	180	+++
	Watte								
	3/10	0,50	0,36	14,3	10,4	200	3	180	++
	3/10	1,16	0,85	27,9	20,4	200	3	180	+++
10	Heu								
	3/5	0,50	0,36	14,3	10,4	200	3	180	++
	3/5	1,16	0,85	27,9	20,4	200	3	180	+++
	Stroh								
15	3/5	0,50	0,36	14,3	10,4	200	3	180	++
	3/5	1,16	0,85	27,9	20,4	200	3	180	+++
	Sägemehl								
	6/10	1,00	0,73	14,3	10,4	200	3	180	++
	6/10	2,32	1,69	27,9	20,4	200	3	180	+++
	Hobelspäne								
20	6/10	1,00	0,73	14,3	10,4	200	3	180	++
	6/10	2,32	1,69	27,9	20,4	200	3	180	+++
	Kiefernspäne								
	6/10	1,00	0,73	14,3	10,4	200	3	180	++
25	6/10	2,32	1,69	27,9	20,4	200	3	180	+++

Tabelle 6 (Fortsetzung)

	Fasermaterial (g/ml)	Zellen (g)	PHB (g)	Anteil Zellen (%)	Anteil PHB (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
5	Spelzen								
	6/10	1,00	0,73	14,3	10,4	200	3	180	++
	6/10	2,32	1,69	27,9	20,4	200	3	180	+++
10	Samenreste								
	12/5	2,00	1,46	14,3	10,4	200	3	75	+/-
	12/5	4,64	3,39	27,9	20,4	200	3	75	+/-
	Haferflocken								
	12/10	2,00	1,46	14,3	10,4	200	3	75	+
15	12/10	4,64	3,39	27,9	20,4	200	3	75	+
	Roggen								
	12/10	2,00	1,46	14,3	10,4	200	3	75	+
	Kleie								
	6/10	1,00	0,73	14,3	10,4	200	3	180	++
20	6/10	2,32	1,69	27,9	20,4	200	3	180	+++
	Papierstreifen								
	6/10	1,00	0,73	14,3	10,4	200	3	180	++
25	6/10	2,32	1,69	27,9	20,4	200	3	180	+++

Beispiel 4

Analog Beispiel 3 wurden Preßlinge aus Fasermaterialien und getrockneten Zellen, die PHD gespeichert hatten (Fermentation 6) hergestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7

- 5 Herstellung von Probepreßlingen aus verschiedenen Fasermaterialien und getrockneten Zellen, die PHF gespeichert hatten. (Fermentation 6; PHD-Gehalt 62 % mit der Zusammensetzung 3 mol % 3-Hydroxyhexanoat, 20 mol% 3-Hydroxyoctanoat, 75 mol% 3-Hydroxydecanoat und 2 mol% 3-Hydroxydecanoat).
- 10 Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

	Fasermaterial (g/ml)	Zellen (g)	PHD (g)	Anteil Zellen (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
	Baumwollreste	Getrocknete Zellen aus Fermentation 6 wurden in Fasermaterial verteilt							
15	3/20	0,15	0,09	4,8	2,9	200	10	75	- keine homogene Verteilung
	3/20	9,23	0,14	7,1	4,3	200	10	75	+/- keine homogene Verteilung
	3/20	0,30	0,19	9,1	5,7	200	10	75	+/- keine homogene Verteilung
	3/20	0,45	0,28	13,0	8,1	200	10	75	- keine homogene Verteilung
	3/20	0,60	0,37	16,7	11,3	200	10	75	+ keine homogene Verteilung
20		Zellen aus Fermentation 6 wurden in 10 ml Chloroform resuspendiert, mit den Fasern vermischt und nach dem Trocknen gepresst.							
	3/20	0,15	0,09	4,8	2,9	200	10	75	- keine homogene Verteilung

Tabelle 7 (Fortsetzung)

5

10

Fasermaterial (g/ml)	Zellen (g)	PHD (g)	Anteil Zellen (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
3/20	0,23	0,14	7,1	4,3	200	10	75	- keine homogene Verteilung
3/20	0,30	0,19	9,1	5,7	200	10	75	- keine homogene Verteilung
3/20	0,45	0,28	13,0	8,1	200	10	75	+/- keine homogene Verteilung
3/20	0,60	0,37	16,7	11,3	200	10	75	+ keine homogene Verteilung
Zellen aus Fermentation 6 wurden in 10 ml Wasser resuspendiert, mit den Fasern vermischt und lyophilisiert.								
3/20	0	0	0	0	200	10	75	- Blindprobe
3/20	0,15	0,09	4,8	2,9	200	10	75	-
3/20	0,23	0,14	7,1	4,3	200	10	75	+/-
3/20	0,30	0,19	9,1	5,7	200	10	75	+
3/20	0,45	0,28	13,0	8,1	200	10	75	++
3/20	0,60	0,37	16,7	11,3	200	10	75	+++
3/20	0,90	0,56	23,1	14,3	200	10	75	+++
3/20	1,2	0,74	28,6	17,6	200	10	75	+++

20

Tabelle 7 (Fortsetzung)

5

10

15

20

25

30

Fasermaterial (g/ml)	Zellen (g)	PHD (g)	Anteil Zellen (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
Flachs								
3/20	0	0	0	0	200	10	75	- Blindprobe
3/20	0,15	0,09	4,8	2,9	200	10	75	- Blindprobe
3/20	0,23	0,14	7,1	4,3	200	10	75	+/-
3/20	0,30	0,19	9,1	5,7	200	10	75	+
3/20	0,45	0,28	13,0	8,1	200	10	75	++
3/20	0,60	0,37	16,7	11,3	200	10	75	+++
3/20	0,90	0,56	23,1	14,3	200	10	75	+++
3/20	1,2	0,74	28,6	17,6	200	10	75	+++
3/20	0,58	0,36	16,2	10,0	200	3	75	++
3/20	1,45	0,90	32,6	20,2	200	3	75	+++
Sisal								
3/5	0,58	0,36	16,2	10,0	200	3	75	++
3/5	1,45	0,90	32,6	20,2	200	3	75	+++
Hanf								
3/10	0,58	0,36	16,2	10,0	200	3	75	++
3/10	1,45	0,90	32,6	20,2	200	3	75	+++
Holzwolle								
3/10	0,58	0,36	16,2	10,0	200	3	75	+
3/10	1,45	0,90	32,6	20,2	200	3	75	+++

Tabelle 7 (Fortsetzung)

5	Fasermaterial (g/ml)	Zelle n (g)	PHD (g)	Anteil Zellen (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
10	Watte								
	3/10	0,58	0,36	16,2	10,0	200	3	75	++
	3/10	1,45	0,90	32,6	20,2	200	3	75	+++
	Heu								
15	3/5	0,58	0,36	16,2	10,0	200	3	75	+
	3/5	1,45	0,90	32,6	20,2	200	3	75	+++
	Stroh								
	3/5	0,58	0,36	16,2	10,0	200	3	75	+
20	3/5	1,45	0,90	32,6	20,2	200	3	75	+++
	Sägemehl								
	6/10	1,16	0,72	16,2	10,0	200	3	75	++
	6/10	2,90	1,80	32,6	20,2	200	3	75	+++
25	Hobelspäne								
	6/10	1,16	0,72	16,2	10,0	200	3	75	++
	6/10	2,90	1,80	32,6	20,2	200	3	75	+++
	Kiefernspäne								
30	6/10	1,16	0,72	16,2	10,0	200	3	75	++
	6/10	2,90	1,80	32,6	20,2	200	3	75	+++
	Spelzen								
	6/10	1,16	0,72	16,2	10,0	200	3	75	++
30	6/10	2,90	1,80	32,6	20,2	200	3	75	+++
	Samenreste								
	12/5	2,32	1,44	16,2	10,0	200	3	75	+
	12/5	5,80	3,60	32,6	20,2	200	3	75	++

Tabelle 7 (Fortsetzung)

5

10

15

20

Fasermaterial (g/ml)	Zellen (g)	PHD (-g)	Anteil Zellen (%)	Anteil PHD (%)	Druck (bar)	Zeit (min)	Temp. Zelle (°C)	Bemerkungen
Haferflocken								
12/10	2,32	1,44	16,2	10,0	200	3	75	+
12/10	5,80	3,60	32,6	20,2	200	3	75	++
Roggen								
12/10	2,32	1,44	16,2	10,0	200	3	75	+
12/10	5,80	3,60	32,6	20,2	200	3	75	++
Kleie								
6/10	1,16	0,72	16,2	10,0	200	3	75	++
6/10	2,90	1,80	32,6	20,2	200	3	75	+++
Papierstreifen								
6/10	1,16	0,72	16,2	10,0	200	3	75	++
6/10	2,90	1,80	32,6	20,2	200	3	75	+++

Beispiel 5:

Analog dem Vorgehen aus Beispiel 3 wurde die Kulturbrühe von Bakterien direkt, daß
 25 heißt ohne Lyophilisieren und nachfolgendem Resuspendieren mit dem Fasermaterial
 vermischt, gefriergetrocknet und anschließend verpreßt. Geeignete Mikroorganismen sind
 der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

5

10

15

Bakterium	Substrat	Faseranteil	Bewertung
-	-	Baumwollreste	-
Rh.ruber	Glucose	Baumwollreste	+++
Rh.ruber	Glucose	Baumwollreste	+
M.extorquens B65	Methanol	Baumwollreste	+
M.extorquens B65	Methanol	Baumwollreste	+/-
M.rhodesianum	Methanol	Baumwollreste	+/-
A.eutrophus H16	Gluconat	Baumwollreste	++
A.eutrophus H16	Gluconat	Baumwollreste	++
P.sp.GP4BH1	Gluconat	Baumwollreste	+++
P.sp.DSM1650	Gluconat	Baumwollreste	+++
P.putida KT2440	Gluconat	Baumwollreste	-
P.putida KT2440	Octanoat	Baumwollreste	-

20

Bei zusätzlichem Aufschluß der Mikroorganismen vor dem Vermischen durch Behandlung mit Ultraschall zeigten die Preßlinge aus Ansätzen mit M. extorquens B65 "+++".

Beispiel 6:

25

Zur Untersuchung der Verwertung von Cellulosesubstraten von zur Speicherung von PHF befähigten Bakterien gemäß Beispiel 5, wurden diese auf verschiedenen cellulosehaltigen Materialien angezogen. In flüssiges Mineralmedium wurden verschiedene autoklavierte Fasermaterialien gegeben und mit Bakterien von frischen NB-Agarkulturen angeimpft.

30 Anhand der zunehmenden Trübung der Lösung, die auch durch das Wachstum der Bakterien hervorgerufen sein konnte, wurde auf ein verwertbares Substrat in der Nährlösung geschlossen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9

Verwertung von cellulosehaltigen Fasermaterialien durch verschiedene Bakterien gemäß Beispiel 5

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

Substrat	P. fluorescens var. cellulosa						C. fimi						Rh. ruber						S. marcescens					
	1d	2d	4d	7d	1d	2d	4d	7d	1d	2d	4d	7d	1d	2d	4d	7d	1d	2d	4d	7d	1d	2d	4d	7d
1,0 % Glucose	+++				+++				++	+++			++	+++			+++				+++			
0,1 % Octanoat	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	n.b.				n.b.				n.b.							
Whatmanpapier	+/-	+++	+++A		+	+++	+++A		+/-	+/-			+/-	+/-			+	++	+++					
Whatmanpapier -YE	+/-	+/-	+	+++A	-	-	-	-	+	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Whatmanpapier + 1,0% Glucose	++	+++			+++				+++				+	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
Whatmanpapier + 0,1% Octanoat	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	n.b.				n.b.				n.b.							
Matte	-	-	-	-	-	-	+/-	+	+/-	+	+	++	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
Baumwolle	-	+/-	+	++					+/-	+	++	++	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
Baumwolle + 1,0% Glucose	+++				++	+++			++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Baumwolle + 0,1% Octanoat	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	n.b.				+/-	+/-	+/-	+/-	n.b.				n.b.			
Flachs	-	+/-	++	+++A	+/-	+/-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 9 (Fortsetzung)

Substrat	P. fluorescens var. cellulosa					C. finl				Rh. ruber				S. marcescens			
	1d	2d	4d	7d		1d	2d	4d	7d	1d	2d	4d	7d	1d	2d	4d	7d
Sisal	+	+	+	++		+	+	++	++	-	-	+/-	+/-	+	++	++	++
Holzspille	-	-	-	-		+/-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Stroh	+	+	++	++		+/-	+	++	+++	n.b.				n.b.			
Heu	+/-	++	++	+++		+/-	+	++	++	n.b.				n.b.			
Laaserdruck	+	+++	+++A			+	+++A			n.b.				n.b.			
Papierhandtuch	+/-	+++	+++	+++		+	+++	+++	+++	n.b.				n.b.			
Illustrierte	+/-	+	+++	+++		+	+	+++	+++	n.b.				n.b.			
Tageszeitung	+/-	+	+	++		+/-	+/-	+	+	n.b.				n.b.			

; Bakterien haften an dem Fasermaterial; a, erste Auflösungserscheinungen sind sichtbar; A, Cellulosesubstrat ist vollständig aufgelöst; d, Tage; YE, Hefeextrakt, n.b., nicht bestimmt.

Die vollständige Zersetzung von Cellulosematerial wurde nur bei *P. fluorescens* var. *cellulosa* und *Cellulomonas fimi* bei Anzucht auf bestimmten Substraten beobachtet (Tabelle 9). Von den untersuchten Substraten wurden insbesondere Whatmanpapier (spezielles Laborlöschpapier) und Laserausdrucke auf weißem Papier von beiden
5 Organismen innerhalb von vier Tagen vollständig aufgelöst und abgebaut. Innerhalb von einer Woche löste *P. fluorescens* var. *cellulosa* auch Flachs auf. Weitere nutzbare Substrate sind Illustriertenpapier und Recycling-Papierhandtücher, wohingegen bei Baumwollresten, Watte, Sisal, Holzwolle und anderen Substraten keine Auflösungserscheinungen innerhalb von einer Woche erkennbar waren (Tabelle 9). Teilweise war
10 allerdings auch auf den makroskopisch nicht zersetzten Substraten ein Wachstum der Kultur in Form von einer Trübungszunahme erkennbar (Tabelle 9). Octansäure hemmt das Wachstum beider Bakterien. Ohne Hefeextrakt konnte *C. fimi* nicht wachsen, das Wachstum von *P. fluorescens* var. *cellulosa* war ohne Hefeextrakt verlangsamt (Tabelle 9).

15

Das mikroskopische Bild zeigte, daß sich *P. fluorescens* var. *cellulosa* während des Wachstums an die Cellulosefasern anheftete, während dies bei *C. fimi* nicht der Fall war. Beide Stämme wurden als celluloseverwertende Referenzstämme von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) bezogen. *C. fimi* speicherte auf allen getesteten
20 Substraten kein PHF, während *P. fluorescens* var. *cellulosa* nur äußerst geringe Mengen PHD (ca. 1 % der Zelltrockenmasse synthetisierte. Dieser geringe Anteil reichte nicht zum Verkleben von Fasern aus.

Bei allen anderen untersuchten Bakterien, die ein geringfügiges Wachstum auf den
25 getesteten Substraten zeigten, blieb das Cellulosematerial makroskopisch unverändert, der Zellertrag war niedrig und PHF konnten gaschromatographisch nicht nachgewiesen werden (Tabelle 9). Da die meisten der eingesetzten Materialien Naturstoffe darstellen (Sisal, Flachs, Stroh, Heu) oder anderweitig heterogen zusammengesetzt sind (Baumwollreste, bedrucktes Papier), enthalten diese eine Vielzahl von Substanzen neben
30 dem Grundstoff Cellulose. Diese werden möglicherweise durch verschiedene Bakterien verwertet und als Wachstumssubstrat genutzt. Desweiteren führen chemische Aufbereitungsprozesse bei der Herstellung der Endprodukte möglicherweise zu einer

leichteren oder erschwerten Verwertbarkeit. Die Ursache für das beobachtete Zellwachstum einiger Pseudomonaden auf Baumwollresten, Whatmanpapier oder Flachs durch einen Abbau von Cellulose oder von Verunreinigungen innerhalb des Fasermaterials beruht, könnte daher nur durch vollständige Zersetzung der Cellulose belegt werden. Da

5. Cellulose aus kristallinen und amorphen Bereichen besteht, die unterschiedlich gut durch Bakterien verwertet werden können, ist möglicherweise auch der Anteil dieser Bereiche innerhalb der Fasern für eine eingeschränkte Verwertbarkeit und ein eingeschränktes Wachstum verantwortlich. Eine Behandlung der Cellulosefasern, beispielsweise durch Natronlauge, vor der Verwendung als Substrat sollte die Verwertbarkeit fördern.

10

- Wurden die oben beschriebenen Kulturen, die Fasermaterialien enthalten, mit Glucose nachgefüttert, setzte sofortiges Wachstum ein und die unterschiedlichen Stämme waren nach etwa 24 Stunden ausgewachsen. Granulate aus akkumulierten Polymeren waren dann nach 24 bis 48 Stunden unter dem Mikroskop im Phasenkontrast sichtbar. Bezüglich
- 15 des makroskopischen Erscheinungsbildes konnten deutlich zwei Formen unterschieden werden. Die Mehrzahl der Kulturen enthielt dann homogene Bakteriensuspensionen, in denen die Zellen nicht an den Fasern anhafteten. Einige wenige Stämme bildeten dagegen sowohl Aggregate, die nur aus Zellen bestehen, wie auch Aggregate, die aus Zellen und Fasern bestehen. Dies sind P.sp. GP4BH1, das PHB und PHD speichern kann
- 20 (Steinbüchel und Wiese (1992) "A Pseudomonas strain accumulating polyesters of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids" Appl. Microbil. Biotechnol. 37, 691-697) und Rhodococcus ruber in der Fähigkeit zur Akkumulation von PHB/HV. Im Falle von Rh. ruber forderte die Zugabe von Thiamin oder Hefeextrakt als Supplinen das Wachstum. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10

Der Bewertungsmaßstab entspricht der Tabelle 2.

	Bakterium	Substrat	Faseranteil	Bewertung/Bemerkungen
5	Rh. ruber	Glucose	Flachs	+++
	Rh. ruber	Glucose	Watte	++
	Rh. ruber	Glucose	Baumwollreste	++
	Rh. ruber	Glucose	Flachs	+++
10	M. extroquens B65	Methanol	Flachs	+++
	M. extroquens B65	Methanol	Flachs	+++
	M. extroquens B65	Methanol	Baumwollreste	++
	M. extroquens B65	Methanol	Baumwollreste	+
	M. rhodesianum	Methanol	Baumwollreste	+++
15	M. rhodesianum	Methanol	Baumwollreste	+
	P. sp. GP4BH1	Gluconat	Flachs	+
	P. sp. GP4BH1	Gluconat	Baumwollreste	+++
	P. putida KT2440	Gluconat	Baumwollreste	-
	P. citronellolis	Gluconat	Baumwollreste	-
20	A. eutrophus H16	Gluconat	Baumwollreste	+++
	A. eutrophus H16	Gluconat	Baumwollreste (t=48h)	+++
	A. eutrophus H16	Gluconat	Baumwollreste	+++
	A. eutrophus H16	Gluconat	Baumwollreste (t=48h)	+++
	A. eutrophus H16	Gluconat	Watte	+++
25	A. eutrophus H16	Gluconat	Holzwolle	+++
	A. eutrophus H16	Gluconat	Flachs	+++
	A. eutrophus H16	Gluconat	Sisal	+++

PATENTANSPRÜCHE

- 5 1. Verwendung eines Verbundwerkstoffes aus Fasermaterial und Bindemittel aus einem Polymer von Hydroxyfettsäuren zur Herstellung von Formteilen im Automobilbereich, insbesondere zu akustischen Dämpfung in den Bereichen Motorhaube, Stirnwand (beidseitig), Tunnel, Tür, Dach, Fußraum, Pumpen, A- bis D-Säule und Lüftungskanal und als gegebenenfalls selbsttragende Basis für
10 Innenauskleidungen, insbesondere für Armaturenabdeckungen, Tunnelverkleidungen, Türverkleidungen, Rückenlehnenverkleidungen, A-Bis D-Säulenverkleidungen und Reserveradabdeckungen sowie als Teile mit Doppel-funktion insbesondere als Dachhimmel, Hutablage, Füllstück, Kofferraummatte oder Radhausverkleidung.
- 15 2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Fasermaterial ausgewählt ist aus Flachs, Sisal, Hanf, Holzwolle, Holzschliff, Holzfasern, Kokosfasern, Leder, Watte, Heu, Stroh, Sägemehl, Hobelspänen, Kiefernspänen, Spelzen, Samenresten, Haferflocken, Getreide, Kleie, Papierstreifen, Baumwollresten, Kunstfasern wie
20 Polybutylenterephthalate, Polyethylenterephthalate, Nylon 6, Nylon 66, Nylon 12, Viskose und Rayon.
3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Monomere der Hydroxyfettsäuren des Polymers von gesättigten oder ungesättigten 3-Hydroxy-
25 fettsäuren mit 4 bis 16 Kohlenstoffatomen abgeleitet im Fettsäurerest einsetzt.
4. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man das Polymer von Hydroxyfettsäuren aus Monomeren einer oder
30 verschiedener Hydroxyfettsäure(n) einsetzt.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polymer von Hydroxyfettsäuren aus Poly-3-hydroxybuttersäure (PHB), Copolymer Poly-3-hydroxy-

buttersäure-3-Hydroxyvaleriansäure (PHB/HV) und Poly-3-hydroxydekansäure oder Gemische derselben einsetzt.

- 5 6. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man 5 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 35 Gew.-% an Polymer von Hydroxyfettsäuren des Verbundwerkstoffs einsetzt.
- 10 7. Verfahren zur Herstellung eines Verbundwerkstoffes aus Fasermaterial und Bindemittel aus einem Polymer von Hydroxyfettsäuren, wie in einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 definiert, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer aus Hydroxyfettsäuren-produzierende Mikroorganismen in Anwesenheit von Fasermaterial und einer weiteren Kohlenstoffquelle angezogen, die Bakterien mit
15 samt den Fasern geerntet und im getrockneten oder feuchten Zustand, gegebenenfalls unter Einsatz weiteren Fasermaterials zu Verbundwerkstoffen gepreßt werden.
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Polymer aus Hydroxyfettsäuren-produzierende Mikroorganismen in Anwesenheit von Fasermaterial ohne weitere Kohlenstoffquelle angezogen werden, wobei die Bakterien einen Teil des Fasermaterials als Kohlenstoffquelle verwerten, die Bakterien mit samt den Fasern geerntet werden und im getrockneten oder feuchten Zustand, gegebenenfalls unter Einsatz weiteren Fasermaterials zu
25 9. Verfahren nach Anspruche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismus ein PHF-Synthesegen-exprimierender rekombinanter Mikroorganismus eingesetzt wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP 96/04939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 D04H1/00 C12P7/62 D04H1/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 D04H C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 385 (C-1227), 20 July 1994 & JP 06 107935 A (SHOWA HIGHPOLYMER CO LTD), 19 April 1994, see abstract & DATABASE WPI Section Ch, Week 9420 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A23, AN 94-164139 & JP 06 107 935 (SHOWA HIGH POLYMER) , 19 April 1994 see abstract	1
Y	--- US 5 350 627 A (NEMPHOS SPEROS P. ET AL) 27 September 1994 cited in the application see claim 1 --- -/-	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 1997

Date of mailing of the international search report

21.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Goovaerts, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/04939

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 095, no. 008, 29 September 1995 & JP 07 119098 A (SHOWA HIGHPOLYMER CO LTD), 9 May 1995, see abstract & DATABASE WPI Section Ch, Week 9527 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A23, AN 95-204529 & JP 07 119 098 (SHOWA HIGH POLYMER) , 9 May 1995 see abstract ---	1
X	EP 0 444 880 A (AGENCY IND SCIENCE TECHN ;CHUOKAGAKU LTD (JP)) 4 September 1991 see page 3, line 1 - line 40 ---	1
X	WO 92 05311 A (DU PONT) 2 April 1992 see claim 1 ---	1
A	US 5 191 037 A (DOI YOSHIHARU ET AL) 2 March 1993 see column 2, line 58 - column 3, line 5 ---	7,8
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 339 (C-1075), 28 June 1993 & JP 05 041923 A (RAKUTOU KASEI KOGYO KK;OTHERS: 01), 23 February 1993, see abstract & DATABASE WPI Section Ch, Week 9313 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 93-103567 & JP 05 041 923 (DAIKA JAPAN;RAKUTO KASEI KOGYO) , 23 February 1993 see abstract -----	7,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 96/04939

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5350627 A	27-09-94	NONE	
EP 0444880 A	04-09-91	CA 2037340 A	29-08-91
		JP 5320524 A	03-12-93
		JP 7078167 B	23-08-95
		US 5206087 A	27-04-93
WO 9205311 A	02-04-92	AU 8517891 A	15-04-92
		CA 2090975 A	27-03-92
		CN 1060129 A	08-04-92
		EP 0550490 A	14-07-93
		JP 6500603 T	20-01-94
US 5191037 A	02-03-93	JP 6184418 A	05-07-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen
PCT/EP 96/04939

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 D04H1/00 C12P7/62 D04H1/58

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 D04H C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 385 (C-1227), 20. Juli 1994 & JP 06 107935 A (SHOWA HIGHPOLYMER CO LTD), 19. April 1994, siehe Zusammenfassung & DATABASE WPI Section Ch, Week 9420 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A23, AN 94-164139 & JP 06 107 935 (SHOWA HIGH POLYMER) , 19. April 1994 siehe Zusammenfassung	1
Y	US 5 350 627 A (NEMPHOS SPEROS P ET AL) 27. September 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Anspruch 1 ---	1
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. März 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21. 04. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (- 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Goovaerts, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 095, no. 008, 29.September 1995 & JP 07 119098 A (SHOWA HIGHPOLYMER CO LTD), 9.Mai 1995, siehe Zusammenfassung & DATABASE WPI Section Ch, Week 9527 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A23, AN 95-204529 & JP 07 119 098 (SHOWA HIGH POLYMER) , 9.Mai 1995 siehe Zusammenfassung ---	1
X	EP 0 444 880 A (AGENCY IND SCIENCE TECHN ;CHUOKAGAKU LTD (JP)) 4.September 1991 siehe Seite 3, Zeile 1 - Zeile 40 ---	1
X	WO 92 05311 A (DU PONT) 2.April 1992 siehe Anspruch 1 ---	1
A	US 5 191 037 A (DOI YOSHIHARU ET AL) 2.März 1993 siehe Spalte 2, Zeile 58 - Spalte 3, Zeile 5 ---	7,8
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 339 (C-1075), 28.Juni 1993 & JP 05 041923 A (RAKUTOU KASEI KOGYO KK;OTHERS: 01), 23.Februar 1993, siehe Zusammenfassung & DATABASE WPI Section Ch, Week 9313 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 93-103567 & JP 05 041 923 (DAIKA JAPAN;RAKUTO KASEI KOGYO) , 23.Februar 1993 siehe Zusammenfassung -----	7,8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

International: Aktenzeichen

PCT/EP 96/04939

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5350627 A	27-09-94	KEINE	
EP 0444880 A	04-09-91	CA 2037340 A	29-08-91
		JP 5320524 A	03-12-93
		JP 7078167 B	23-08-95
		US 5206087 A	27-04-93
WO 9205311 A	02-04-92	AU 8517891 A	15-04-92
		CA 2090975 A	27-03-92
		CN 1060129 A	08-04-92
		EP 0550490 A	14-07-93
		JP 6500603 T	20-01-94
US 5191037 A	02-03-93	JP 6184418 A	05-07-94